

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

8



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 06 295.8

Anmeldetag:

02. Februar 2001

Anmelder/Inhaber:

GAIFAR German American Institute for
Applied Biomedical Research GmbH, Potsdam/DE

Bezeichnung:

Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen,
welches immobilisiert ist

IPC:

C 07 K 17/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Januar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

Albrecht, Lüke & Jungblut
Patentanwälte
Gelfertstr 56, 14195 Berlin

DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lüke
Patentanwalt /European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: GAI/DE/0004

Datum: 02.02.01

Anmelder: GAIFAR German American Institute for Applied Biomedical
Research GmbH

Biotech Campus
Hermannswerder 15/16
D-14473 Potsdam

Titel: Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist.

Erfinder: Dr. Heinrich REPKE, Zingerleweg 27, D-14089 Berlin
Dr. Eckhard BUDDE, Lausitzer Platz 10, D-10997 Berlin

Priorität: ---

Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist, eine für ein solches Protein codierende Polynukleotide, einen Expressionsvektor enthaltend solche Polynukleotide, eine mittels eines solchen Expressionsvektors transformierte Zelle, sowie Verwendungen eines solchen Proteins zur Herstellung eines Immobilisats und zur Herstellung eines HIV Tests.

15

Hintergrund der Erfindung.

Immobilisate aufweisend eine feste Phase und ein oder mehrere an der festen Phase gebundene Proteine sind vielfältig aus der Praxis bekannt. Solche Immobilisate werden einerseits zum Nachweis von an das Protein spezifisch bindenden Substanzen eines flüssigen Analysats und andererseits zur Abtrennung solcher Substanzen aus einer Flüssigkeit eingesetzt. Dabei weist das Protein ein Epitop auf, welches für die nachzuweisende oder abzutrennende Substanz spezifisch ist, und dieses Epitop ist in der Regel über eine Spacerverbindung, die als solche nicht an die Substanz bindet, an die feste Phase gebunden. Die Spacerverbindung gewährleistet u.a., daß das Protein sich im Bereich des Epitops in einer Weise faltet, die der Faltung des nativen Epitops entspricht. Dies, i.e. die

gewünschte Exponierung des Epitops, ist die Voraussetzung dafür, daß eine Bindung der Substanz überhaupt möglich ist. Insbesondere wird die Ausbildung unerwünschter Disulfidbrücken verhindert.

5

In manchen Bereichen der Medizin ist es wünschenswert, wenn verschiedene Epitope gleichzeitig an der festen Phase immobilisiert sind. Dies ist beispielsweise im Falle von HIV-Tests wünschenswert, da nur eine Ansammlung von Epitopen, welche für Antikörper für verschiedene HIV1 und HIV2 Stämme und Subtypen spezifisch sind, eine zuverlässige Aussage auf Basis des Testergebnisses darüber gewährleisten, ob die getestete Probe HIV Antikörper, welchen Subtyps auch immer, enthält oder nicht, i.e. ob eine Person HIV positiv ist oder nicht.

Grundsätzlich könnten die jeweiligen Proteine, beispielsweise Antigene gegen diverse HIV Antikörper, jeweils für sich an der festen Phase immobilisiert werden. Dies birgt jedoch verschiedene Probleme. Ein erstes Problem besteht darin, daß eine gleichmäßige Verteilung der Proteine, insbesondere hinsichtlich der Konzentrationen, und somit eine hinreichend gleichförmige Sensitivität für verschiedene Antikörper nicht gewährleistet werden kann. Denn verschiedene Proteine können zu Verdrängungsreaktionen an der festen Phase führen mit der Folge von in beachtlichem Maße störenden Konzentrationsunterschieden an der festen Phase, auch bei äquimolarem Auftrag. Weiterhin sind bei einer höheren Vielzahl von verschiedenen Proteinen Wechselwirkungen der verschiedenen Proteine im Zuge der Immobilisierung nicht auszuschließen. All dies

stört jedoch, wenn gleichsam ein Universaltest,
beispielsweise auf HIV, hergestellt werden soll. Die
vorstehenden Ausführungen treffen natürlich sinngemäß
auf grundsätzlich alle Erkrankungen zu, die, je nach
5 Klassen und Subtypen des infizierenden Organismus,
immunologisch unterscheidbare Antikörper in einem Kör-
per hervorrufen können. Es versteht sich, daß gegen
einen spezifischen Subtyp auch unterschiedliche An-
tikörper gebildet sein können.

10

Im Zusammenhang mit HIV ist folgendes ergänzend an-
zumerken. Die erworbene Immunschwächekrankheit AIDS
(aquired immunodeficiency syndrome) wird durch das HIV
verursacht. Die beiden bisher beobachteten Erreger-
15 stämme HIV-1 und HIV-2 haben eine sehr ähnlich Genom-
struktur und infizieren T-Zellen über einen sehr
ähnlichen Mechanismus. Sie unterscheiden sich aber
immunologisch so weit, daß Antikörper gegen HIV-1 in
der Regel keine Kreuzreaktion mit HIV-2 zeigen und
20 umgekehrt. Bei HIV-1 werden zudem eine Reihe von Sub-
typen unterschieden, wobei die Gruppe M mehrere Sub-
typen umfaßt (A,B,C,D,E,F und G) und der Subtyp O in
eine eigene Gruppe (Gruppe O) gestellt wird. Auch
zwischen den Antikörpern gegen verschiedene Subtypen
25 bestehen immunologische Unterschiede. Daher ist es
schwierig, in einem einzigen Testsystem alle Subtypen,
bzw. alle Antikörper hiergegen, zuverlässig zu erken-
nen. Dies gilt in besonderem Maße für Schnelltests,
die ohne großen experimentellen Aufwand durchzuführen
30 sein müssen. In einem Schnelltest sollte durch einma-
ligen Auftrag beispielsweise einer Blutprobe ein zu-
verlässiges Ergebnis erhältbar sein. Insbesondere im

Zusammenhang mit HIV müssen falsch negative und falsch positive Ergebnisse praktisch ausgeschlossen sein.

5 Stand der Technik.

Beispielhaft für den Einsatz eines oder mehrerer Antigene in Mischung gegen verschiedene HIV Antikörper ist die Literaturstelle US-A-5,830,641.

10

Bisher bekannte Schnelltests arbeiten demgegenüber in Regel mit einem einzigen Antigen, nämlich gp41, und sind daher nicht in der Lage, alle HIV-Subtypen zuverlässig und mit hoher Sensitivität zu erkennen. Es

15 besteht also ein sehr beachtliches Risiko falsch negativer Ergebnisse. Sie sind zudem nicht über längere Zeit temperaturstabil, nicht für eine permanente Dokumentation geeignet, gewährleisten keine einfache und sichere Entsorgung und zeigen bei Überentwicklung 20 ein falsch positives Ergebnis.

Fusionsproteine mit mehr als einem Epitop für HIV Antikörper sind an sich bekannt beispielsweise aus den Literaturstellen US-A-5,800,822 und US-A-5,310,876.

25 Hierbei handelt es sich um Proteine, die in Lösung im Rahmen von Labortests eingesetzt werden. Solche Labortestsysteme sind jedoch für Schnelltests aufgrund der komplexen Handhabung und dem bei Ausführung durch nicht ausgebildete Personen folglich hohen Risiko 30 falscher Ergebnisse nicht geeignet.

Aus der Literaturstelle US-A-4,925,784 ist ein Fusionsprotein gag/env bekannt, welches auch

immobilisiert sein kann. Brückenverbindungen mit Bindungsstellen für eine Bindung mit einer festen Phase zwischen gag und env sind nicht entnehmbar. Das Fusionsprotein ist einseitig über eine Brücke an einer festen Phase gebunden.

Aus der Literaturstelle DE 197 20 914 A1 sind verschiedene Antigene gegen Antikörper verschiedener Subtypen bekannt. Die Antigene können an einer Festphase gebunden sein. Verschiedene Antigene werden als Gemisch eingesetzt. Sofern Antigen mit multiplen Epitopen angesprochen sind, so handelt es sich um Hapten, i.e. Proteine mit mehrfachen Sequenzen eines einzigen Epitop-Typs.

15

Die Literaturstelle US-A-5,241,047 beschreibt Peptide, welche mit Seren HIV-positiver Probanden reagieren. Dabei sind diverse Epitope unmittelbar aneinander gekoppelt und können über eine Spacersequenz am c- oder N-terminalen Ende an einer Festphase gebunden sein. Mittels einer Spacersequenz wird die Beabstandung einer Signalsequenz von einem Trägermaterial erreicht. Ein Ende der Spacersequenz ist an das Trägermaterial und das andere an ein Ende der Signalsequenz gebunden. An jede Spacersequenz ist nur eine einzige Signalsequenz gekoppelt.

Technisches Problem der Erfindung.

30

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein immobilisierbares Protein anzugeben, das für einen Schnelltest auf Vorliegen von Antikörpern in einer

Patientenprobe eingesetzt werden kann und in einem solchen Schnelltest zuverlässig eine Erkennung vieler bis aller Gruppen und Subtypen eines Erregers bzw. von Antikörpern hiergegen erlaubt.

5

Grundzüge der Erfindung.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der festen Phase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind.

Die Erfindung beruht auf einer Kombination von Erkenntnissen. Eine erste Erkenntnis liegt darin, daß sich die Nachteile des Einsatzes einer Mischung von Antigenen dadurch vermeiden lassen, daß die Antigen-Epitope in einem einzigen Protein kombiniert werden. Dann kann eine Immobilisierung unschwer erfolgen, ohne daß unterschiedliche Affinitäten zur Festphase und/oder Wechselwirkungen verschiedener Antigene untereinander zu störenden Verschiebungen der Verteilungen führen. Hieran anschließend beruht die Erfindung auf der weiteren Erkenntnis, daß es nicht ausreicht, lediglich verschiedene Epitope aneinander zu reihen und dann das Produkt an einem Ende (oder beiden Enden) an der Festphase zu binden. Vielmehr muß erreicht

werden, daß die Epitope nach der Immobilisierung in gewünschter Weise exponiert sind, i.e. eine Sekundär- und ggf. Tertiärstruktur bilden, die eine Bindung der zugeordneten Antikörper gewährleistet und zudem ster-
5 isch die Zugänglichkeit ermöglicht. Schließlich wurde erkannt, daß dies erreichbar ist, indem zwischen den Epitopen Brückenverbindungen eingerichtet werden, welche einerseits die Bindung an die Festphase be-
wirken und andererseits für die gewünschte Exponierung
10 der Epitope sorgen. Das Konzept besteht also im Kern aus der Schaffung eines einziges Proteins mit mehreren beabstandeten Epitopen, wobei die Epitope durch Zwischenschaltung der Brückenverbindungen wiederum gleichsam vereinzelt sind. Durch geeignete Wahl der
15 Brückenverbindungen, insbesondere der Strukturen der beiseitig eines Epitops sich bis zu den beidseitigen Bindungsstellen an der Festphase erstreckenden Teile der jeweiligen Brückenverbindungen lassen sich zudem die Epitope auf definierte Weise falten, so daß die
20 Exponierung sicher gewährleistet und zudem gleichsam fixiert ist. Schließlich ist der Konzeption der Er-
findung inhärent, daß störende Wechselwirkungen ver-
schiedener Epitope eines Proteins praktisch ausgeschlossen sind.

25

Geeignete Brückenverbindungen lassen sich nach Maßgabe der diese flankierenden Epitop Strukturen bzw. sequenzen mit den Mitteln des molecular modelling unschwer berechnen. Zusätzlich oder alternativ kann der
30 Durchschnittsfachmann experimentell verschiedene Brückenverbindungen auf Eignung testen, indem die Bindungsfähigkeit von Antikörpern an die die

Brückenverbindung flankierenden Epitope mit üblichen Methoden getestet wird.

Es versteht sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein 5 Enden besitzen muß. Ein Ende kann das Ende eines Epitops sein, welches weder direkt noch indirekt an die Festphase gebunden ist. Ein Ende kann weiterhin ein Ende einer Brückenverbindung sein, wobei das Ende der Brückenverbindung die Bindungsstelle sein kann oder, 10 bezogen auf das angeschlossene Epitop, jenseits der Bindungsstelle liegen kann. Ein Ende kann schließlich auch durch ein Tag, insbesondere ein Affinitäts-Tag, gebildet sein.

15 Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, ein erfindungsgemäßes Protein zu erstellen. Beispielsweise kann eine Brückenverbindung durch Insertion von Brückensequenzen zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in 20 einer Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein. Die Brückenverbindung kann auch durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein.

25 Als Brückenverbindungen kommen die verschiedensten Moleküle in Frage. Grundsätzlich können beliebige organische Substanzen, typischerweise kettenartige Verbindungen, eingesetzt werden. Als Beispiele sind Oligomere auf Basis gleichartiger oder verschiedenartiger Monomere der Polymerchemie zu nennen. Bevorzugt ist es, wenn die Brückenverbindung aus Aminosäuren gebildet ist. Die Brückenverbindung muß eine Bindungsstelle für die Festphase aufweisen. Üblicherweise wird

hierfür eine positiv geladene Bindungsstelle zur Bindung an eine negativ geladene Festphase, vorzugsweise eine Membran, eingerichtet.

- 5 Grundsätzlich können die Antigen-Epitop-Sequenzen innerhalb des Proteins gleich sein. Besonders bevorzugt ist es jedoch, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden. Idealerweise werden solche verschiedenen Antigen-Epitop-Sequenzen in einem
10 erfindungsgemäßen Protein oder in einigen wenigen erfindungsgemäßen Proteinen miteinander kombiniert, daß Antikörper der häufigsten, besser aller, Subtypen einer Erregergattung erkannt werden. Die Antigen-Epitop-Sequenzen können beispielsweise repetitive Sequenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV Subtypen sein. Bevorzugt ist es allerdings, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.
15
20 Grundsätzlich kann die Brückenverbindung aus einer beliebigen Sequenz gebildet sein, wobei die Brückenverbindung beispielsweise ein Sequenzelement aus gp120 ist. Bevorzugt ist es, wenn Teilsequenzen, welche im Blut enthaltene Antikörper unspezifisch binden, de-
25 letiert sind. Dies gilt sowohl bezüglich der Brückenverbindung als auch der Antigen-Epitop-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Verwendung erfindungsgemäßer Proteine zur Herstellung eines Immobilisats zur Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird und wobei optional die
30

Festphase mit dem daran gebundenen Protein zumindest einer Spülverfahrensstufe und/oder Blockierungsverfahrensstufe unterworfen wird, sowie eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins zur Herstellung eines

5 HIV Tests, wobei ein erfindungsgemäßes Immobilisat hergestellt wird, wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt wird und wobei eine Detektorlösung entweder in einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht ist oder separat zur Aufbringung auf das

10 Immobilisat beigefügt wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Polynukleotid, insbesondere cDNA, codierend für ein erfindungsgemäßes Protein, einen Expressionsvektor, vorzugsweise Plasmid, enthaltend eine Polynukleotid Sequenz kodierend für ein erfindungsgemäßes Protein, und eine Zelle, welche mittels eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors transformiert ist.

20 Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen ausgewählt werden und die Ordnung der Aneinanderreihung definiert wird, wobei für die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen codierende DNA in einer Expressionsvektor aneinander in der definierten Weise anschließend und unter üblicher Vorschaltung eines geeigneten Promotors insertiert wird, wobei eine Zelle, vorzugsweise *E. coli*, mittels des Expressionsvektors transformiert wird, wobei transformierte Zellen selektiert und kultiviert werden, und wobei das von den selektierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird.

Ein erfindungsgemäßer HIV Test weist im Kern beispielsweise den folgenden Aufbau auf. In einer Ausführungsform als "flow through" befindet sich ein 5 poröses Material, meist eine Membran, in einer Vorrichtung, beispielsweise einem Kunststoffgehäuse, welche eine Zugriffsöffnung zu der Membran aufweist. An für Flüssigkeiten zugänglichen Oberflächen der Membran ist zumdest ein erfindungsgemäßer Protein Typus 10 immobilisiert. Durch die Zugriffsöffnung wird eine zu testende Probe, beispielsweise Blut, Serum oder Plasma, auf die Membran aufgetragen. U. a. aufgrund von Kapillarkräften dringt die Probe in die Membran ein bzw. tritt durch sie hindurch. Dies kann unter- 15 stützt werden beispielsweise durch eine Unterfütterung der Membran mittels eines saugfähigen Materials. Die Probe bzw. darin eventuell enthaltene Antikörper reagieren mit dem Protein. Durch Auftrag einer üblichen Detektorlösung, beispielsweise gefärbte Partikel wie 20 kolloidale Goldpartikel, erfolgt ein visueller Nachweis für die Bindung von Antikörpern an das Protein. Alternativ zur "flow through" Technologie kann mittels einem "lateral flow" Verfahren gearbeitet werden. Hierbei wird ebenfalls eine Membran eingesetzt, die 25 allerdings in lateraler Richtung unterteilt ist in eine Aufbringzone und eine Reaktionszone. Kapillarkraftbedingt wandert die in der Aufbringzone aufgebrachte Probe in die Reaktionszone, in welcher zumdest ein erfindungsgemäßer Protein Typus immobi- 30 lisiert ist. In der Aufbringzone werden keine erfindungsgemäße Proteine immobilisiert sein, es ist aber durchaus möglich, in der Aufbringzone andere Stoffe, beispielsweise Proteine, zu immobilisieren,

welche zu detektierende Antikörper nicht binden, dagegen aber in der Probe unerwünschte Stoffe binden und so abtrennen. Hierdurch wird die Zuverlässigkeit der Antikörper-Detektion beachtlich erhöht, da ggf. 5 unerwünschte Wechselwirkungen aufgrund anderer Blutbestandteile ausgeschaltet werden können. Die Reaktionszone kann eine Detektorsubstanz bereits enthalten, es kann aber auch vorgesehen sein, daß in der Detektorzone separat ein Auftrag von Detektorlösung 10 erfolgt.

Die Erzeugung einer Gesamtsequenz aus Antigen-Epitop-Sequenzen und zwischengeschaltenen Brückenverbindungen, welche geladen sind, beispielsweise positiv 15 geladen sind, hat im übrigen auch besondere präparative Vorteile. Wenn ein solches Protein gentechnisch hergestellt wird durch Expression in einer Zelle, so ist zunächst eine Aufreinigung des Proteins aus einem Zellextrakt zweckmäßig. Die Ladungen der Brückenver- 20 bindungen erlauben nunmehr eine besonders effektive und einfache Reinigung auf sehr hohe Reinheitsgrade in einer Ionenaustauscherchromatographie, da der isoelektrische Punkt extrem hoch ist. Mit einer solchen Au- freinigung eines gentechnisch herstellten . 25 erfindungsgemäßen Proteins vor einer Immobilisierungsverfahrensstufe wird somit auch ein hinsichtlich gebundenen Proteins besonders reines Immobilisat erhalten. Dies erhöht letztendlich die Zuverlässigkeit eines Testsystems in beachtlichem Maße.

Der Begriff des HIV-Tests bezeichnet eine Nachweis-methode zur Detektion von HIV-Antikörpern in Körper-bestandteilen, insbesondere Körperflüssigkeiten.
Körperflüssigkeiten sind beispielsweise Blut, Serum,
5 Plasma, Speichel, Harn oder Liquor.

Der Begriff des Protein umfaßt im Rahmen der Erfindung Verbindungen, die natürliche oder nicht-natürliche Aminosäuresequenzen enthalten. Ein Protein kann syn-
10 thetisiert oder jedenfalls hinsichtlich der Ami-nosäuresequenzen isoliert sein. Insofern umfaßt der Begriff des Proteins auch Peptide. Ein Protein muß nicht notwendigerweise ausschließlich aus Aminosäuren gebildet sein. Insbesondere die Brückenverbindung kann
15 anders als aus Aminosäuren aufgebaut sein.

Als Antikörper ist bezeichnet eine durch einen Organ-ismus natürlicherweise in Verfolg einer Infektion durch Immunreaktion gebildete Substanz, welche an den
20 Erreger der Infektion oder Bestandteilen hiervon spezifisch zu binden vermag.

Als Antigen ist bezeichnet, eine Substanz, welche spezifisch an einen Antikörper zu binden vermag. Anti-
25 gen und Antikörper sind einander zugeordnet nach Maßgabe des zu detektierenden Antikörpers bzw. der zu detektierenden Antikörper.

Eine Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet eine Ami-nosäuresequenz, gebildet aus natürlichen und/oder
30 nicht natürlichen Aminosäuren, die einerseits chemisch bindungsfähig an einen zugeordneten Antikörper ist und andererseits eine solche Sekundär- und/oder

Tertiärstruktur aufweist, daß die rein chemische Bindung auch sterisch, i.e. nach dem "Schlüssel/Schloß-Prinzip", ermöglicht ist.

- 5 Der Begriff der Immobilisierung bezeichnet die Bindung einer Substanz aus der Flüssigphase an einer Feststoffoberfläche. Der Begriff der Bindung umfaßt die Chemisorption, die ionische Bindung, die kovalente Bindung sowie Zwischenformen solcher Bindungen.

10

Eine Brückenverbindung ist eine typischerweise oligomere Verbindung, deren Art der Monomere, deren Reihenfolge bzw. Sequenz und deren räumliche Ausrichtung, einschließlich eventueller interner oder externer Vernetzung, definiert ist. Insbesondere definiert sind Positionen der Enden der Brückenverbindung untereinander. Hierbei muß u.U. aber auch die jeweils angeschlossene bzw. anzuschließende Antigen-Epitop-Sequenz sowie die gegenüberliegende Brückenverbindung berücksichtigt werden, wenn die Anzahl der Freiheitsgrade der Brückenverbindung eine hinreichend eindeutige Definition der räumlichen Stellung der Enden nicht ohne weiteres zuläßt. Eine Brückenverbindung ist nicht notwendigerweise eine artifizielle Sequenz bzw. eine artifiziell zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen eingefügte Sequenz. Es kann sich auch um eine native Sequenz zwischen zwei natürlicherweise beabstandeten Antigen-Epitop-Sequenzen handeln, wobei eine oder mehrere Aminosäuren auch ausgetauscht sein können.

Eine Bindungsstelle bezeichnet im Rahmen der Terminologie der Patentansprüche eine reaktive Gruppe der

Brückenverbindung, mittels welcher eine Immobilisierung an der Festphase erreichbar ist.

Exponieren einer Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet die 5 Einstellung der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur der Sequenz so, daß eine Bindung an den Zielantikörper erfolgen kann. Insbesondere meint dies daher die Faltung im Bereich der Antigen-Epitop-Sequenz. Die Faltung kann auch unter Einbeziehung der Ausbildung von 10 Disulfidbrücken erfolgen. Die Faltung führt in der Regel zur Ausbildung eines spezifischen Loops. Eine falsche Faltung führt zu einem falschen Loop. Eine falsche Faltung kann erfolgen, wenn die Enden einer Antigen-Epitop-Sequenz in ungeeigneter Weise räumlich 15 zueinander stabilisiert sind.

Mit dem Merkmal der Brückenverbindung wird letztendlich erreicht, daß die Teile von zwei Brückenverbindungen, welche zwischen zwei benachbarten 20 Bindungsstellen liegen, die Enden der zwischengeschalteten Antigen-Epitop-Sequenz so stabilisieren, daß eine gewünschte Faltung eingestellt wird. Wesentlich ist hierbei, daß die beiden Bindungsstellen geometrische Fixpunkte sind aufgrund der Bindung an der Festphase. Selbstverständlich können zwischen dem Ende 25 einer Brückenverbindung und der daran angeschlossenen Antigen-Epitop-Sequenz nicht-funktionelle Sequenzen zwischengeschaltet sein, solange dies die vorstehend beschriebenen Zusammenhänge nicht berührt.

30

Eine Brückensequenz ist eine Brückenverbindung, welche aus mehreren natürlichen und/oder nicht-natürlichen Aminosäuren gebildet ist.

Der Ausdruck der verschiedenen Antikörper meint Antikörper unterschiedlichen Typus bzw. unterschiedlicher Struktur. Entsprechendes gilt im Zusammenhang mit 5 Genen, Stämmen, Subtypen und dergleichen.

Der Begriff der Spezifität bezeichnet die Fähigkeit einer Substanz, aus einer Anzahl gebotener Wechselwirkungsmöglichkeiten bzw. Reaktionsmöglichkeiten eine 10 ganz Bestimmte oder eine Gruppe von ganz Bestimmten wahrzunehmen. Ein für einen bestimmten Antikörper bzw. eine bestimmte Bindungssite eines Antikörpers spezifisches Antigen wird mit anderen, in einer Probe, ggf. nach Abtrennung von die Spezifität störenden Stoffen, 15 vorhandenen Antikörpern, die diese Bindungssite nicht aufweisen, keine Reaktion zeigen. Dagegen sind Antigene bzw. Sequenzen, welche eine Mehrzahl verschiedener Antikörper einer Probe binden, unspezifisch.

20

Der Begriff der Detektion bezeichnet die Erzeugung eines beliebigen direkt mittels der Sinne oder indirekt mittels physikalisch/chemischer Meßmethoden wahrnehmbaren Detektorsignals, welches seine kausale 25 Ursache in einem Antikörper/Antigen Bindungseignis hat. Im einfachsten Fall handelt es sich um eine Farbreaktion. Detektionsmethoden für Antikörper/antigen Bindungseignisse sind dem Fachmann in vielfältiger Weise bekannt und brauchen nicht näher erläutert zu 30 werden.

Eine Detektorlösung enthält eine oder mehrere Substanzen, die zur Erzeugung eines Detektorsignals nach

Maßgabe eines Bindungsergebnisses Antikörper/Antigen
in der Lage sind.

Der Ausdruck der Festphase bezeichnet einen Festkörper
5 mit einer für Bindungsstellen bindungsfähigen
Oberfläche.

Eine Spülverfahrensstufe umfaßt das Spülen eines
erzeugten Immobilisats, i.e. einer Festphase mit daran
10 gebundenem Protein, mit einer Lösung, welche schwach
gebundene Proteine und/oder andere Substanzen von der
Oberfläche der Festphase entfernt.

Eine Blockierungsverfahrensstufe umfaßt das Spülen
15 eines Immobilisats mit einer Lösung, welche eine oder
mehrere Substanzen enthält, die nicht in Bindung mit
Protein gegangene Bereich der Oberfläche der Festphase
absättigt, i.e. für die Bindung anderer Substanzen
direkt an der Oberfläche der Festphase, blockiert.

20

Ausführungsformen der Erfindung.

Im Folgenden werden lediglich beispielhaft nicht
25 beschränkende Ausführungsformen der Erfindung näher
erläutert.

Beispiel 1.

30

Im Folgenden werden Beispiele für artifizielle Brück-
enverbindungen gegeben, welche im Rahmen eines

erfindungsgemäßen Proteins zum Nachweis von HIV Antikörpern einsetzbar sind.

Die Brückenverbindung 1 kann die folgende Sequenz
5 aufweisen:

GKR--K-RK-KR--RRG

wobei "--" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren
10 steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung
ist:

GKRAHKSRKHNYKRHIRRG

15 Die Brückenverbindung 2 kann die folgende Sequenz
aufweisen:

G-KK-RR-KGK-RR-KK-G

20 wobei "--" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren
steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung
ist:

GSKKARRIKGKMRLKKVG

25

Die Brückenverbindung 3 kann die folgende Sequenz
aufweisen:

G-C-K-R-KRKXKRK-K--C-G

30

wobei "--" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren
steht und wobei "X" für D oder E steht. Ein Beispiel
für eine solche Brückenverbindung ist:

GVCIKHRYKRKDKRKHKVACIG

Die vorstehenden und nachfolgenden Buchstaben in Sequenzinformationen basieren auf dem Single Letter Code.

Beispiel 2.

10

Im Folgenden wird eine native Brückenverbindung angegeben, welche für ein erfindungsgemäßes Protein zum Nachweis von HIV Antikörpern geeignet ist.

15 GVA--K-KRR---REKRAVG

wobei "--" für eine beliebige Aminosäure steht. Diese Brückenverbindung stammt aus dem HIV-1 Envelope Gen.

20

Beispiel 3.

Im Folgenden werden erfindungsgemäße Proteine unter Verwendung von Brückenverbindungen u.a. aus den Beispielen 1 und/oder 2 näher beschrieben. Die Tabelle 1 gibt Möglichkeiten der Deletion und/oder Einfügung von Brückenverbindungen in Sequenzen mit Antigen-Epitopen wieder. Geeignete Sequenzen ID I bis ID VI mit Antigen-Epitopen sind in der Figur 1a-f wieder-gegeben, wobei es sich um vollständige Sequenzen von HIV Proteinen handelt (wobei allerdings für die Erfindung nicht notwendigerweise mit vollständigen Sequenzen als Ausgangssequenzen gearbeitet werden muß).

Beispiel 4.

In der Figur 2 sind Sequenzen Seq. ID A bis E dargestellt, wobei A bis D erfindungsgemäße Proteine 5 sind, E jedoch ein nicht erfindungsgemäßes Protein ist. In den Sequenzen A bis D sind Modifikation so ausgeführt, daß zwischen den Antigen-Epitop Sequenzen geeignete Brückenverbindungen entstehen. Dagegen findet in E keine hinreichende Präsentation von Antigen-10 Epitop Sequenzen statt. In der Figur 3a/b sind die Strukturen der Proteine C bis E dargestellt, wozu in einzelnen auf die folgenden Beispiele verwiesen wird.

15 Beispiel 5.

In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins beschrieben, nämlich von p31 $\Delta 100/40, 140/23, 163/14 \Omega 31/2, 100/3$

20

Lesart:

 $\Delta X/Y$ (z.B. $\Delta 100/76$) : Hinter der Aminosäure an Position

100 sind 76 Aminosäuren deletiert

 $\Omega X/Y$ (z.B. $\Omega 30/2$): Hinter der Aminosäure 30 ist die

25 Brückenverbindung 2 insertiert

Teilschritt 1

Das Fragment 1 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen.

30 Als Primer dienen für die Amplifikation die Oligonukleotide 5'-ATATGGCATATGTTTAGATGGAATAGATAAGG-
CCC-3' und 5'-TATAGGGCCCAGGTGGCAGGTTAAA-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach

üblichem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte PCR-Produkt (ca. 110bp) wird isoliert und einer Restriktion mit ApaI und NdeI unterworfen.

5 Fragment 1 (Epitope 1, PCR)

H^{3'~}

atatggM F A G E S T I R L A T G C A T G A T A G G C G C
.....TTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGA
.....M F L D G I D K A Q D E H E K Y H S N W R
.....AAAATCTACCTTATCTATTCCGGGTCTACTTGTACTCTTATAGTGTCACTAACCTCT
.....
10 GCAATGGCTAGTGATTAACTGCCACCT.....
.....A M A S D F N L P P
.....CGTTACCGATCACTAAAATTGGACGGTGGA.....
.....A G G T T G G A C G G G T G C A C C G G G A t a t
.....
.....ApaI

Teilschritt 2

15 : Zwei Oligonukleotide
(5'-CAAAAAGGCCGTCGCATCAAGGGCAAATGCGACGGGTGAAGAAAG-3' und
5'-CCGGCTTCTTCACCGTCGCATTTGCCCTGATGCGACGGCCTTTGGGCC
-3') werden bei 100°C kurz denaturiert, im linear
20 abfallenden Temperaturgradienten miteinander hybridisiert
und das Doppelstrangprodukt anschließend isoliert.

Fragment 2 (Brückenverbindung 2, synthetisch)

25 ApaI
CAAAAAGGCCGTCGCATCAAGGGCAAATGCGACGGGTGAAGAAAG
.....G P K K A R I K G K M R R V K K A G
.....CCGGTTTCCGGCAGCGTAGTCCCGTTACGCTGCCACTTCTTCGGCC
.....NgoMIV

30 Teilschritt 3

Das Fragment 3 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen.
Als Primer dienen für die Amplifikation die

Oligonukleotide 5'-TAATTTGCCGGCGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAG-3' und 5'-TATAGCATGCTCCATATGCTGTTCCCTGCCCTGT-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach bekanntem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte

- 5 PCR-Produkt (233bp) wird einer Restriktion mit NgoMIV und SphI unterworfen und anschließend isoliert.

Fragment 3 (Epitop 2, PCR) (233bp)

20 Teilschritt 4

Zwei Oligonukleotide

25 (5'-CATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGCATAAAAGTGGCCT
 GC-3' und
 5'-CTAGGCAGGCCACTTTATGCTTCCGACGATCGCGTCGCTTGTAGCGGTGTTGAT
 G-3') werden bei 100°C kurz denaturiert, im linear
 abfallenden Temperaturgradienten miteinander hybridisiert
 und das Doppelstrangprodukt isoliert.

30 Fragment 4 (Brückenverbindung 3, synthetisch)

Sphi
 CATGCATCAAACACGGCTACAAAGCGATGCGATCGTCGGAAGCATAAAAGTGGCTGC
 A C I K H R Y K R R D R R K H K V A C I G
 GTAGTTTGTGAGATGTTGGCTGGCGTAGCAGCCCTTCGTTACCGGCGAGCGATC

AvrII

*
Teilschritt 5

5 Das Fragment 5 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen.
 Als Primer dienen für die Amplifikation die
 Oligonukleotide 5'- ATTATCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCCAC-3'
 und 5'-TATAGGATCCTAATCCTCATCCTGTCTACTTGC-3', als Template
 wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach
 10 bekanntem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte
 PCR-Produkt (360bp) wird einer Restriktion mit AvrII und
 BamHI unterworfen und anschließend isoliert.

Fragment 5 (Epitop 3, PCR)

15

AvrII

ATTAATCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCCAC
 CAAATGGCAGTATTCCACAAATTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCA
 C I G Q M A V F I H N F K P K G G I G G Y S A

20

GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAAACTAAAGAATTACAACAA
 G E R I V D I I A T D I Q T K E L Q K Q

ATTACAAAAATTCAAAATTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAAATCCACTTGGAAA
 I T K I Q N F R V Y Y R D S R N P L W K

GGACCAGCAAAGCTCTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGAC
 G P A K L L W K G E G A V V I Q D N S D

ATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCA
 I K V V P P P K A K I I R D Y G K Q M A

25

GGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAG
 G D D C V A S R Q D E D *
 CCACTACTAACACACCGTTCATCTGCCTACTCCTAAC

BamHI

30 Teilschritt 6

Ein geeigneter Expressionsvektor wird mit NdeI und BamHI
 geschnitten und das Vektorfragment isoliert.

Teilschritt 7

Das aufgereinigte Vektorfragment und die jeweils
5 isolierten Teilfragmente werden mit Hilfe von
Ligationsreaktionen miteinander verknüpft.

Teilschritt 8

10 Geeignete E.coli Zellen werden mit den Ligationsprodukten
transformiert und selektioniert.

Teilschritt 9

15 Aus erhaltenen Kolonien wird die Plasmid-DNA isoliert und
auf Vorhandensein, Anordnung und Orientierung der
Teilsequenzen mit den Enzymen NdeI, ApaI, NgoMIV, SphI,
AvrII und BamHI in verschiedenen Kombinationen geprüft.
Plasmid-DNA mit positivem Ergebnis wird zur Bestätigung
20 sequenziert.

p31 nativ

p31Δ100/40, 140/23, 163/14 Ω31/2, 100/3

25	Frg. 1	Frg. 2	Frg. 3	Frg. 4	Frg. 5	
	NdeI	ApaI	NgoMIV	SphI	AvrII	BamHI

Gesamt nukleotidsequenz:

CATATTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGATGAACTGAGAAATATCACAGTA
30 ATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTAAACCTGCCACCTGGCCAAAAAGGCCCGTCG
CATCAAGGGAAAATGCGACGGTGAAGAAAGCCGGGTAGTAGCAAAGAAATAGTA
GCCAGCTGTGATAATGTCAGCTAAAGGAGAACCATGCATGGACAAGTAGACTGTA
GTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTAGAAGGAAAAGTTATCCTGGTAGC

AGTTCATGTAGCCAGTGGATATAGAACAGAAGTTATTCCAGCAGAAACAGGGCAG
 GAAACAGCATATGGAGCATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGC
 ATAAAGTGGCCTGCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTAAAAGAAAAGG
 GGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA
 5 CAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTGGGTTATTA
 GGGACAGCAGAAATCCACTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGG
 GGCAGTAGTAATACAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAG
 ATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG
 ATGAGGATTAGGATCC

10

Gesamtaminosäuresequenz:

MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKKARRIKGMRRVKKAGVVAKEIVA
 SCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVILVAHVVASGYIEAEVIPAETGQE
 15 TAYGACIKHRYKRRDRRKHKVACIGQMAVFIHNFKRNGGIGGYSAGERIVDTIATDIQ
 TKELQKQITKIQNFRVYYRDSRNPLWKGPAKLLWKGEGAVVIQDNSDIKVVPKKAKI
 IRDYGKQMAGDDCVASRQDED*

Die Expression eines erfindungsgemäßen Proteins wird wie
 20 folgt durchgeführt. Nachdem die kodierende Nukleinsäure
 für das zu exprimierende Protein hergestellt und über
 Restriktionsschnittstellen in einen handelsüblichen Vektor
 eingebaut wurde, erfolgt eine Transformation des Plasmids
 in eine handelsübliche *E. coli*-Zelle. Nach einer
 25 Inokulierung eines Mediums (z.B. LB-Medium) mit dem
 Transformationsansatz erfolgt die Anzucht der Zellkultur
 durch Inkubation bei einer optimalen Temperatur (z.B.
 37°C). Die Protein-Expression wird durch eine Zugabe von
 Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und
 30 durch eine Fortführung der Inkubation erreicht. Nach dem
 Ernten der *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation wird eine
 Zelllyse mit einem Lysispuffer (z.B. einem
 Guanidinhydrochloridhaltigen Puffer) durchgeführt.

Die Reinigung des Proteins kann über herkömmliche Chromatographiemethoden (z.B. Ionenaustauscherchromatographie und Gelchromatographie) erfolgen, wobei der durch Einfügen positiv geladener Sequenzen erhöhte 5 isoelektrische Punkt der Proteine vorteilhaft benutzt werden kann, die Proteine über Kationenaustauscherchromatographie stark anzureichern. Üblicherweise werden die chromatographischen Trennungen mit Hilfe von Chromatographiesäulen, in die das Material eingebracht 10 wird, durchgeführt. Falls die Proteine mit einem „tag“ (z.B. einem N- oder C-terminalen His6-Peptid, einem „flag-tag“ oder myc-Epitop) versehen wurden, können sie durch Verwendung einer Affinitätschromatographie gereinigt werden, wobei das jeweilige Protein über den „tag“ an das 15 entsprechende Affinitätschromatographiematerial (z.B. für His6-tag an Ni-NTA-Material) gebunden wird. Nachdem das Material mit entsprechenden Waschpuffern mehrmals gewaschen wurde, wird das gewünschte Protein mit Hilfe von mindestens einem Elutionspuffer (z.B. durch einen Puffer 20 mit deutlich erhöhten oder erniedrigten pH-Wert) von dem Material abgetrennt. Abschließend werden die Eluate noch mehreren Dialyseschritten unterzogen, um die Weiterverwendung des Proteins zu erlauben.

25

Beispiel 6.

In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfundungsgemäßen Immobilisats beschrieben. Das gere- 30 inigte Protein wird in geeigneter Weise mit einer wäßrigen Lösung von 100 mM NaCl und 0,4 - 0,8 % SDS verdünnt. Von dieser Lösung werden mit Hilfe eines BioDot-Gerätes (Cambridge, England) 0,5 µl auf eine

Nitrozellulosemembran aufgebracht, so daß sich auf einem Fleck mit 3 - 4 mm Durchmesser 250 ng Protein befinden. Die Membran wird nach Aufbringen des Proteins für mindestens eine Stunde getrocknet, bevor die 5 Nachweisreaktion durchgeführt wird.

Es wird ein Immobilisat erhalten, bei welchem die Anordnung und Faltung des Proteins in einer Weise erfolgt ist, die schematisch in der Figur 3a dargestellt ist. Die 10 Epitope sind durch eine positiv geladene Peptidsequenz getrennt, was eine Anheftung an die Membran und eine richtige Faltung der Epitope (unterstrichene Sequenzbereiche) erlaubt.

15 Zu der in Fig. 3a dargestellten Faltung mag angemerkt werden, daß möglicherweise nicht alle Proteinmoleküle, die auf die feste Phase aufgebracht werden, sich in der skizzierten Weise falten werden. Ein Teil der Moleküle kann, verursacht durch die Lyse der Zellen und die 20 anschließende Reinigungsprozedur in ungeordnetem (denaturiertem) Faltungszustand vorliegen. Für den Zweck der Erfindung ist aber ausreichend, wenn bei einem erfindungsgemäß konstruierten Protein die Wahrscheinlichkeit einer für die Bindung von Antikörpern geeigneten 25 Faltung, induziert durch die durch den Einbau der Brückenverbindungen ermöglichte optimale Anheftung auf der festen Phase, gegenüber einem keine Brückenverbindungen enthaltenden Protein deutlich erhöht ist. Durch diese erhöhte Wahrscheinlichkeit der "richtigen" Faltung wird 30 die Möglichkeit der Bindung der Antikörper insgesamt stark verbessert und damit die Erhöhung der Sensitivität des gesamten Nachweisverfahrens gewährleistet.

Beispiel 7.

Ein Immobilisat aus Beispiel 6 wurde mit Seren aus 5 diversen HIV positiven Patienten beschickt und die Reaktion wurde mittels einer Detektorlösung geprüft. Es zeigte sich in allen Fällen eine für die Bindung Antikörper/Antigen spezifische Farbreaktion. Falsch negative Ergebnisse wurden nicht erhalten. Versuche 10 mit Seren von HIV negativen Personen ergaben, daß keine einzige falsch positive Anzeige erhalten wird.

Beispiel 8.

15

In diesem Vergleichsbeispiel wurde mit einem Protein env 4 (ID E) ein Immobilisat entsprechend der Verfahrensweise nach Beispiel 6 hergestellt. Der Unterschied besteht ausweislich einer vergleichenden 20 Betrachtung der Figuren 3a und 3c jedoch darin, daß zwischen den linksseitig liegenden Epitopen keine positiv geladene Brückenverbindung eingerichtet ist. Man erkennt weiterhin, daß dadurch die beiden linkss seitigen Epitope nahe beiaander liegen und so gefaltet 25 werden - unter Ausbildung von die Antigenizität zerstörenden Disulfidbrücken -, daß eine Bindung eines Antikörpers nicht erfolgen kann.

Mit gleicher Proteinmenge, wie in Beispiel 7 wurden 30 wiederum Tests mit Seren diverser HIV positiver Patienten durchgeführt. Durchweg wurde praktisch keine Reaktion angezeigt, wurden also regelmäßig falsch negative Ergebnisse erhalten.

Beispiel 9.

5 In diesem Beispiel wird anhand der Figur 3b ein erfundungsgemäßes Protein (ID D) bzw. Immobilisat mit repetitiven Sequenzelementen aus verschiedenen HIV-Subtypen schematisch dargestellt (auch gleiche sind möglich). Dieses erfundungsgemäße Protein ist dabei
10 nur aus V3 Loops verschiedener HIV Subtypen gebildet, die durch ein positiv geladenes Sequenzelement aus gp120 getrennt sind.

15 Beispiel 10.

Ein erfundungsgemäßer Schnelltest ist wie folgt aufgebaut. Ein Immobilisat gemäß Beispiel 6 wird in einem Kunststoffgehäuse unter einer Zugriffsöffnung so positioniert und fixiert, daß zumindest ein Teilbereich des Immobilisats dem Zugriff unterliegt. Das Immobilisat ist dabei mit einer saugfähigen Unterlage, beispielsweise Watte, unterfüttert. Zu dem Schnelltest gehört eine separat abgepackte Detektorlösung.

25

Der Nachweis von an das Antigen gebundenen Antikörpern kann mit Hilfe einer Detektionslösung erfolgen, die ein Konjugat aus Protein A mit kolloidalem Gold enthält. Die Verwendung von solchen Konjugaten in immunologischen Testverfahren ist allgemein bekannt und in der Literatur beschrieben. Dieses Konjugat kann beispielsweise wie in US 5,541,059 beschrieben hergestellt werden durch Mischen von 100 ml einer

kolloidalen Gold-Lösung (kommerziell erhältlich) mit 100 ml einer 0.006 mg/ml enthaltenden Lösung von Protein A (Protein A ist als sowohl in lyophilisierter Form als auch als Lösung kommerziell erhältlich).

5 Alternativ kann ein Protein A-Gold-Konjugat auch kommerziell erworben werden.

Die Bindung des Konjugats an die gebundenen Antikörper kann visuell detektiert werden. Im vorliegenden Beispiel 10 ergibt sich bei Vorhandensein von gebundenen Antikörpern ein rötlicher Fleck.

Alternativ zu den Konjugaten mit kolloidalem Gold kann auch eine Farbstoffsuspension verwendet werden, wobei 15 Protein A an einen wasserunlöslichen Farbstoff adsorbiert wird.

Ein Schnelltest wird wie folgt durchgeführt. Einem Probanden wird durch Nadelstich eine kleine blutende 20 Wunde zugefügt. Der entstehende Bluttropfen wird in einer kleinen Kapillare aufgenommen. Die Kapillare mit dem Blut wird dann in einem Behälter mit einem geigneten Lösungsmittel, beispielsweise physiologische Kochsalzlösung, zusammengegeben und solange geschüttelt, bis Blut und Lösungsmittel sich vermischt haben. 25 Der Inhalt des Behälters wird dann über die Zugriffsöffnung auf das Immobilisat gegeben. Sodann wird die Detektorlösung aufgegeben und visuell beobachtet, ob eine Verfärbung des durch die Zugriffsöffnung 30 sichtbaren Immobilisats erfolgt. Verfärbung bedeutet, daß HIV-Antikörper in dem Blut des Probanden vorliegen. Tritt keine Verfärbung ein, so ist das Ergebnis dagegen negativ.

Patentansprüche:

- viii
1. Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für
5 Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase
über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert
ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über
Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet
sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der
10 Festphase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine
Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssi-
gen Phase exponiert sind.

 - 15 2. Protein nach Anspruch 1, wobei eine Brückenver-
bindung durch Insertion von Brückensequenzen
zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder
Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in einer
Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen
20 gebildet sind.

 - 25 3. Protein nach Anspruch 1, wobei die Brückenver-
bindung durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei
Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet ist.

 - 30 4. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die
Brückenverbindung positiv geladene Bindungsstellen
zur Bindung an eine negativ geladene Festphase,
vorzugsweise eine Membran, aufweist.

5. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die „Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden.“

5

6. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen repetitive Sequenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV Subtypen sind.

10

7. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.

15

8. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus einem einzigen HIV Subtyp sind.

20

9. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Brückenverbindung ein Sequenzelement aus gp120 ist.

25

10. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei Teilsequenzen, welche in Körperflüssigkeiten enthaltene Antikörper unspezifisch binden, deletiert sind.

30

11. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Immobilisats zur

Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird und wobei optional die Festphase mit dem daran gebundenen Protein zumind-
5 est einer Spülverfahrensstufe und/oder Blockierungsverfahrensstufe unterworfen wird.

10 12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche
1 bis 10 zur Herstellung eines HIV Tests, wobei
ein Immobilisat nach Anspruch 11 hergestellt wird,
wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt
wird und wobei eine Detektorlösung entweder in
15 einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht
ist oder separat zur Aufbringung auf das Immobili-
sat beigefügt wird.

20 13. Polynukleotid, insbesondere cDNA, codierend für
ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

14. Expressionsvektor, vorzugsweise Plasmid, enthal-
25 tend eine Polynukleotid Sequenz kodierend für ein
Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

15. Zelle, welche mittels eines Expressionsvektors
30 nach Anspruch 14 transformiert ist.

16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach
,, einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Antigen-
Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen aus-
gewählt werden und die Ordnung der Aneinanderrei-
hung definiert wird, wobei für die
5 Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen
codierende DNA in einen Expressionsvektor anein-
ander in der definierten Weise anschließend in-
sertiert wird, wobei eine Zelle, vorzugsweise E.
10 coli, mittels des Expressionsvektors transformiert
wird, wobei transformierte Zellen selektiert und
kultiviert werden, und wobei das von den selek-
tierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird.

15

20

25

30

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das
5 Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der Festphase die Antigen-Epitop-
10 Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind. - Fig. 2

15

20

25

30

3. Permutationstabelle

Tab. 1

Protein	seq ID	Mögliche Deletionen (Δ) (AS-Position/AS-Anzahl)	Einfügestellen (Ω) von den Inserts Brückenvbd. 1, 2, 3 (Seq ID 1-3)	native Brückenvbd. 1 (Seq ID 4)	AS-Position/seq ID) Epitope (Seq ID 5-36)
gag (500 AS)	I.	Δ 1/131 Δ 132/27 Δ 159/150 Δ 309/54 Δ 363/14 Δ 377/73 Δ 450/50	Ω 132(1/3) Ω 249(2/3) Ω 323(1/2/3) Ω 450(1/2/3)	Ω 249(4) Ω 323(4) Ω 450(4)	
pol 1 (561 AS)	II.	Δ 1/60 Δ 61/223 Δ 398/29 Δ 441/120	Ω 61(1/2/3) Ω 228(1/2/3) Ω 284(1/2/3) Ω 436(1/2/3) Ω 535(1/2/3)	Ω 61(4) Ω 284(4) Ω 436(4) Ω 535(4)	
pol 2 (289 AS)	III.	Δ 100/40 Δ 140/23 Δ 163/14	Ω 31(1/2) Ω 100(1/2/3) Ω 140(2/3) Ω 177(1/3)	Ω 140(4) Ω 177(4)	
env 1 (491 AS)	IV.	Δ 1/4 Δ 6/31 Δ 54/18 Δ 107/28 Δ 136/1 Δ 148/34 Δ 230/20 Δ 308/82 Δ 489/2	Ω 44(1/2/3) Ω 87(1/2/3) Ω 160(1/2/3) Ω 253(1/2/3) Ω 417(1/2/3)	Ω 87(4) Ω 160(4) Ω 253(4)	Ω 3(14/17/29-36) Ω 75(13-20/24/27/31) Ω 136(13-36) Ω 137(13-25/35) Ω 213(13-18/23-36) Ω 392(13-36) Ω 452(19/21/34)
env 2 (392 AS)	V.	Δ 1/46 Δ 47/25 Δ 142/13 Δ 156/5 Δ 210/5 Δ 215/25 Δ 240/23 Δ 286/58 Δ 344/48	Ω 8(1/2) Ω 112(1/2/3) Ω 215(1/2/3) Ω 344(1/3)		Ω 8(5-8/9/11/12) Ω 45(9-11) Ω 161(5/7/8) Ω 202(6/7) Ω 214(6-8) Ω 215(9-12) Ω 286(10/11) Ω 344(9-12)
env 3 (360 AS)	VI.	Δ 2/38 Δ 176/54 Δ 257/103	Ω 69(1/2/3) Ω 176(1/2/3) Ω 253(1/2/3)		

2. Aminosäuresequenzen (Single Letter Aminosäurecode) der Insertionen

Tab. 2

Seq ID	Aminosäuresequenz	Seq ID	Aminosäuresequenz
1	GKR--K-RK-KR--RRG	20	IIRQGIHIGPGRFAAW
2	G-KK-RR-KGK-RR-KK-G	21	DVQEMRIGPMMAWYSMG
3	G-C-K-R-KRXXRK-K--C-G	22	ICTRRGIRMGPGQQVYATCT
4	GVA--K-KR---REKRAVG	23	TIVQIKIIIGPLAVYSMYG
5	WIQLQQRLNLIWGCRGKLLICYTN	24	TRKSVRIGPGQAFYAT
6	WIQNQQLLNLIWGCKGRLVCYTN	25	GHTRKSIRIGPGQTFYAT
7	WLQNQQIILNLIWGCKGRLICYTN	26	NTROSTHIGPGALYTTE
8	WLQSQQLLSSNWGCRGKLVCYTN	27	TRKSIHLGPQAFYATGD
9	AIERYLQDQARLNNSWGCTERQVCH	28	YQTRKSIRIGPGQAFYATGD
10	AMEKYLIRDQAIIVNSWGCASFQVCY	29	TVQEIRIGPMMAWYSMGNV
11	AMEKYLKDQARLNNSWGCASFQVCH	30	TRISHTIGPGRVEYRT
12	AIEKYLKHQAAQLNNAWGCASFQVCH	31	TRKGIIHMGPQVLYATKP
13	TRKSIHIGPGQAFYATGD	32	HTRKSIIHIGPGRAYATS
14	TRSISFGIGPGQAFYATT	33	TRKSIHIGPGRAYFTTSMQ
15	TRQRTPIGLQOALYYTTGQF	34	QTRTSITIGPGQQFYRTE
16	RTVQEIRIGPMMAWYSMGA	35	GTRKSVRIGPGQTFYATG
17	TMKRTSITHIGPGQTFYAT	36	TRKGIIHIGPGRAYATG
18	TRRGIPLGPGRAYATL	37	AVGIGINCTRPNNN
19	DSTRESMRIGPGQAFYATG	38	GDIIIGDIRQAHCNIGPTPT

Legende: X ≡ D oder E
 " " ≡ beliebige Aminosäure

Patentanhang

Fig. 1

1. Aminosäuresequenzen (Single Letter Aminosäurecode)

Seq ID I.: gag (500 AS)

M⁻GARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKLKHIVWA-SRELERFAVNPGILLETSEGCRQIILGQLOQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHORIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAAADTGHSNQVSQNY^{+1/3+/-}PIVQNIQGQMVHQAISSPRTLNAAWVKVV⁻EKA^QFSPVPMFSALLSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAAMQMLKETINEEAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGW^{+2/-3+/-}MTNNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPERDYYVDRFYKTLLRAEQA^{+/-1/2/-3+}QANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL⁻AEAMSQVTNSATIM⁻MQRGNFNRNQRKIVKCFENGKEGHTARNCRAPRKKGCKWKGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSPYKGRPGNFLQ^{+1/2/-3+/-}SRPEPTAPPEESERSGVETTPQQKQEPIDKELYPLTSRLSLFGNDPSSQ⁻

Seq ID II.: pol 1 (561 AS)

M⁻PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPPLTEEKIKALVEICTEMEMKEGKISKIGPENPYNTPV^{+1/2/-3+/-}FAI KKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPVNIVIYQYMDDLYVGSDLIEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTPDKKHQKEPF^{+1/2/-3+/-}PLPEKDMSWTVDIQLVPGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLI^{+1/2/-3+/-}RGTAKALTEVIPLTEEALELAENREIKEPVHGVVYDPSKDLIAEIQLQOGQGQWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVWGGKTPKEFKLPIQKET⁻WETWWTEYQWQATWIPEWEFVNTPPLVKLW⁻YOLEKEPIV^{+1/2/-3+/-}GAETF⁻YVDGANANRETKLKGAGYVTNRGRQKVVTLTDTTNQKTELQAIYIALQDSSGLEVNIVTDSQYALGIIQANQDQSESELVNQIEQLIKKEKVYL^{+1/2/-3+/-}WVPAHKGIGGNEQVDKLVSAGIRKV⁻

Seq ID III.: pol 2 (289 AS)

MFLDGIDKAODEHEKYHSNWRAMASDFNLPP^{+1/2/-3+}VVAKEIIVASCDKCOLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVIILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAY^{+1/2/-3+/-}FLLKLAGRWPVKTITHDNGSNFTSATVKAACWAGIKQE^{+1/2/-3+/-}GIPIPYNPQSQQVVESMNKELKRI⁻QVRDQAEHLKTA^{+1/2/-3+/-}QMAVFILHNFKRKGGIGGYSAGERIVDIIATDIQTKELQQITKIQNFRVYYRDSRNPLWKGEGAVVIQDNNSDIKVVPRRKAKIIRDYCKQOMAGDDCVASRQDED

Fig. 1

Seq ID IV.: env 1 (491 AS)

M-DG-+14/17/29-36+-SH-G-TEKLWVTVYYGVPVWKEATTLEFCASDAKAY-^d-DTEVHNV+1/2/3+WATHACVPTD-PNPOEVVLVNVTENFNMW
-KND+13-20/24/27/31+MVEQMHEDIITSL+1/2/3+WDQSLKPCVVKLTPLCVSILKE-^e-CTDLKNDTNTSSSGRMIMEKGEIKNCS-F+13-36+P+
13-25/35+NISTSIRGKVQKEYAFFYKLDII+1/2/3+PIDNDTTSYKLTSCNTSVITOACPKVSEEPPIHYCAPAGEAILKCNKNTFNGT+13-18
/23-36+GPCTNVSTVQCTHGR-^f-PVSSTQLLINGSLAEEEVVI-^{RSV+1/2/3+NFTDNAKTIIVOLNTSVEINCTRPNNTRKRIRIQRGPGRAPH}T
IGKIGNMRQAH-CNI SRAKWNTNLKQIAASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYFCNSTQLENSTWFNSTWSTEGSNNTEGSD-LQ+1
3-36+TITLPCRIKQIINMWQKVGKAMYAP+1/2/3+PISSQIIRCSSNITGLLTDGGNSNNESEIFRPGG+19/21/34+GDMRDNWRSLEYKYKVV
KIEPLGVAPTKAKRKKVQRE-KR-

Seq ID V.: env 2 (392 AS)

M-GSDMRDN+1/2/5-8/9/11/12+WRSELYKKVVKIEPLGVAPTKAKRKKVQREKRAVGIGS-+9-11+ALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTQQA
ROLLSGIVQQNLLRAIEAQQHLIQLQTWVGIKQLQARI+1/2/3+AVERYLKDQQLGIWGCSKGKLICTTAVPWN-^f-ASWSNKSLEQIWN-N-MTWME
+5/7/8+WDREINNYTSLHSLIESQNQKEQEELLIEDKWAISLWN+6/7+WFNITNWLFENN+6-8+W-+1/2/3/9-12+FWYIKLFIIMIVGG
LVGLRIVEAVLSI-^g-VNVRVQGYSPLSFOTHLPIPRGP-DRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN+10/11+GSLALIWDIILSCLFSYHRLRDLILLT
RIVELLGRRGWEALKYWNNLLQYWSQELK+1/3/9-12+NSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL-

Seq ID VI.: env 3 (360 AS)

MM-SSAHGRHTRGVFVLGFGLATAGSAMGAAASLTVSAAQS-RTILLAGIVQQQQQLDVVKRQQELLRLTV+1/2/3+WGTKNLQARVTAIEKYLQDDQA
RLNSWGCAFQVCHTVPWVNDLAPDWDNMTRQWEKQVRYLEANISKSLEQAQIQQEKNMYELOQKLNNSWDIEGNWFDILTSWVKN+1/2/3+YIQYG
VLIIVAVIALRIVIYVQMLSLRKGYRPVESSPPGYIQQIHHKDRGQ-SPANEEETEDGGSNGGDRYWPWP+1/2/3+FIAYI-^f-FLIRQLIRLRL
YSICRDLLSRSFLTLQLIYQNLRDWLRLRTAFLQYGCWIQEAFQAAARATRETLGACRGLMRVLERIGRGILAVPRRIRQGAELLL-

Legende: \vdash bzw. \dashv \equiv Anfang bzw. Ende einer möglichen Deletion

$\ddagger A/B+$ \equiv Mögliche Einfügestellen (Insertionsstellen) einer AS-Sequenz mit der Seq ID A und/oder B

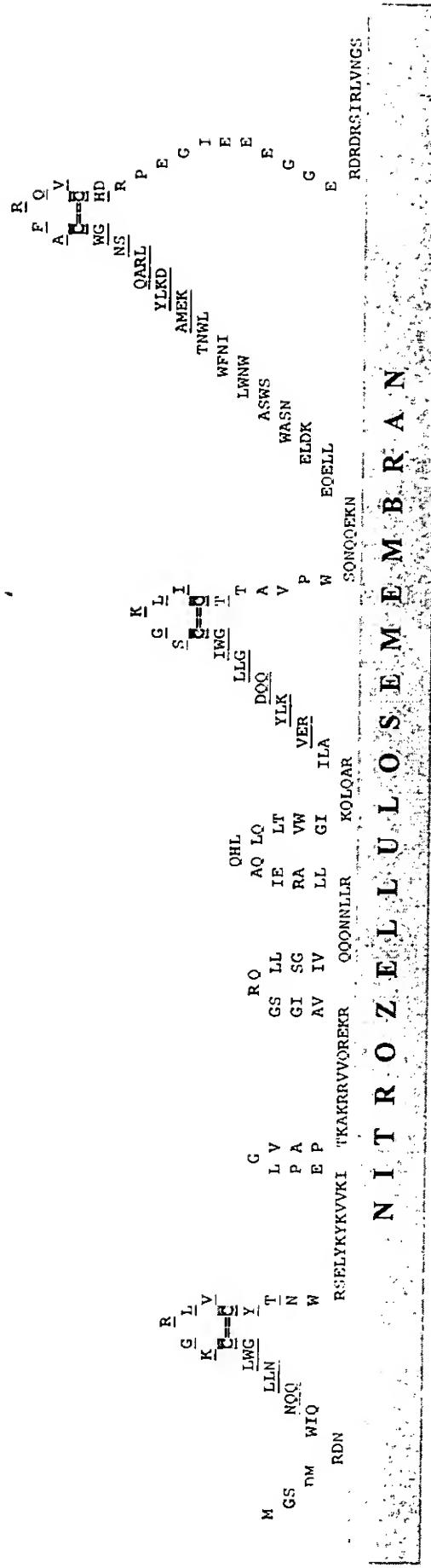
4. Beispielproteine aus der Permutationstabelle (A, B und C) und andere (D und E)

- A. pol 2 Δ 100/40, 140/23, 163/14 Ω 31/2,100/3 (253 AS)
 MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKKARRIKGKMRVKKAGVVAKEIVASCDKCQLKGAEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVILVAVH
 ASGYIEAEVI PAETGQETAYGACIKHRYKRRDRRKHVACIGQMAVEIHNFKRKGIGGYSAGERIVDIIATDIQTKELOQQITRIQNFRVYYRDSRNP
 LWKGPAKLIWKGEAVVIQDNSDIKVVPRRKAKIIRDYKGQMAGDDCVASRQDED
- B. env 2 Δ 47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 Ω 215/11 (232 AS)
 MGSDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRQVVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKOLQARI LAVERYLKDQQQLL
 GIWGCSGKLICLTAVPWNASWSNKSLEQIWNNTWMEDREINNYTSЛИHSLIEESQNQQEКNEQELLELDKWAСLWNWFНITNWLAМEКYLKDQARLN
 SWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN
- C. env 2 Δ 47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 Ω 8/6, 215/11 (254 AS)
 MGSDMRDNWIQNQQLLNWGCKGRLVCYTWNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRQVVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVW
 GIKQLQARI LAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICLTAVPWNASWSNKSLEQIWNNTWMEDREINNYTSЛИHSLIEESQNQQEКNEQELLELDKWAСLWN
 NWFНITNWLAМEКYLKDQARLN SWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN
- D. AS (M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+37+27+38+2+37+25+38+1) (297 AS)
 MGKRAHKSRKIKRVTRRGAVGIGINC TRPNNNTRKSVRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGWKKNRRLKGKYRRMKKWGAVGIGINC TRPN
 NHTRKSIHIGPGRAFYATSGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGACVKHRQKRKEKRYKTA CVGAVGIGINC TRPNNNTRKSIHLGPQAFYATGDDIIGDI
 RQAHCNIGHTPTGSKKARRIKGMRRKKVGAVGIGINC TRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGKRAVKSRSKYKRHIRG
- E. env 4 (221 AS)
 MGSDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRQVVQREALETLLQNQQIILNLWGCKGRLICYWGIKOLQARI LAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICLT
 AVPWNASWSNKSLEQIWNNTWMEDREINNYTSЛИHSLIEESQNQQEКNEQELLELDKWAСLWNWFНITNWLAМEКYLKDQARLN SWGCAFRQVCHDR
 PEGIEEGGERDRDRSIRLVN

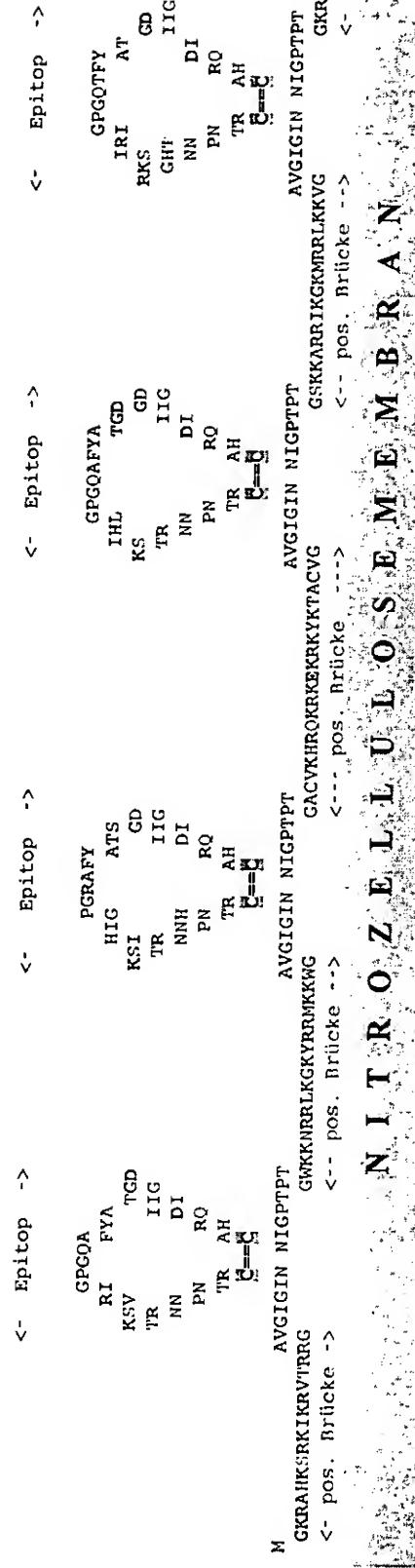
Bindung von Proteinen an die Nitrozellulosemembran

A. Positive Beispiele (4.C. und 4.D.):

\rightarrow 4.C.: env 2 Δ 47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48 Ω 8/6, 215/11

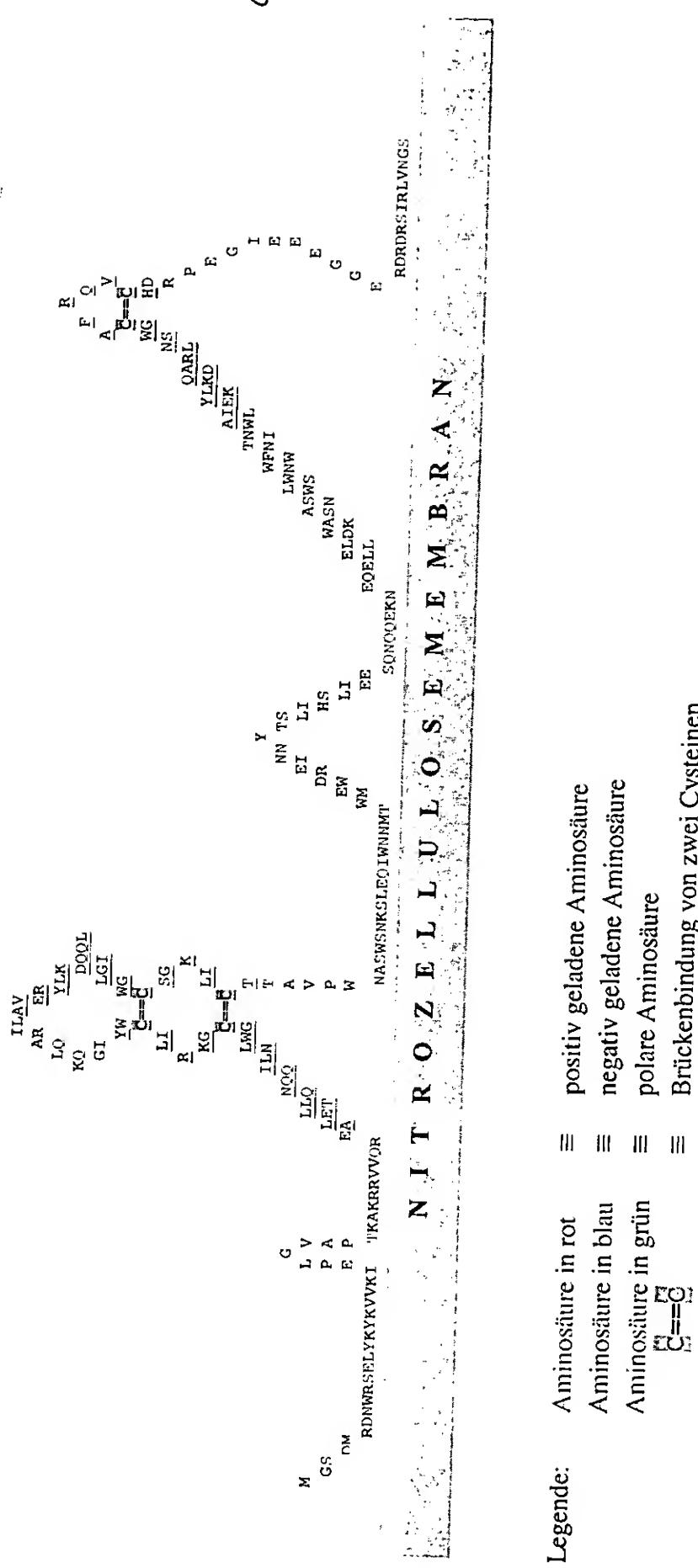


\rightarrow 4. D.: AS(M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+1)



B. Negatives Beispiel (4.E.): env 4

Fig. 3



BACKFILE DOCUMENT INDEX SHEET



A DOCPHOENIX

APPL PARTS

IMIS	NPL
Internal Misc. Paper	Non-Patent Literature
LET.	OATH
Incoming Letter	Oath or Declaration
371P	PET.
PCT Papers in a 371 Application	Petition
A...	RETRN
Amendment Including Elections	Mail Returned by USPS
ABST	SEQLIST
Abstract	Sequence Listing
ADS	SPEC
Application Data Sheet	Specification
AF/D	SPEC NO
Affidavit or Exhibit Received	Specification Not in English
APPENDIX	TRNA
Appendix	Transmittal New Application

IMIS	CTNF
Internal Misc. Paper	Count Non-Final
LET.	CTRS
Incoming Letter	Count Restriction
371P	EXIN
PCT Papers in a 371 Application	Examiner Interview
A...	M903
Amendment Including Elections	DO/EO Acceptance
ABST	M905
Abstract	DO/EO Missing Requirement
ADS	NFDR
Application Data Sheet	Formal Drawing Required
AF/D	NOA
Affidavit or Exhibit Received	Notice of Allowance
APPENDIX	PETDEC
Appendix	Petition Decision

OUTGOING

ARTIFACT	CTMS
Artifact	Misc. Office Action
BIB	1449
Bib Data Sheet	Signed 1449
CLM	892
Claim	892
COMPUTER	ABN
Computer Program Listing	Abandonment
CRFL	APDEC
CRFL Papers for Backfile	Board of Appeals Decision
DIST	APEA
Terminal Disclaimer Filed	Examiner Answer
DRW	CTAV
Drawings	Count Advisory Action
FOR	CTEQ
Foreign Reference	Count Ex parte Quayle
FRPR	CTFR
Foreign Priority Papers	Count Final Rejection
IDS	
IDS Including 1449	

INCOMING

AP.B	
Appeal Brief	
C.AD	
Change of Address	
N/AP	
Notice of Appeal	
PA..	
Change in Power of Attorney	
REM	
Applicant Remarks in Amendment	
XT/	
Extension of Time filed separate	

File Wrapper

FWCLM	
File Wrapper Claim	
IIFW	
File Wrapper Issue Information	
SRFW	
File Wrapper Search Info	

Internal

SRNT	ECBOX
Examiner Search Notes	Evidence Copy Box Identification
CLMPTO	WCLM
PTO Prepared Complete Claim Set	Claim Worksheet

WFEE	
Fee Worksheet	